

## ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ СИСТЕМЫ СИНТЕЗА NO ПРИ РАЗЛИЧНЫХ ПАТОЛОГИЧЕСКИХ ПРОЦЕССАХ

Солодков А.П., Шебеко В.И., Занько С.Н., Семенов В.М.,  
Сушков С.А., Пашков А.А., Кисилева Н.И., Солодкова И.В.,  
Дорошенко А.С., Хотетовская Ж.В., Лазуко С.С.

*Государственный медицинский университет, г. Витебск*

In the period from 1999 – 2003yrs the investigation on determination of stable products concentration of NO monoxide degradation (  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  ), circulating endothelial cells (CEC) in the different pathological processes and their interrelationship with the lipid peroxidation activity have been conducted .

1. The methods of determination of nitrate nitritis in biological fluids have been modifying. Concentration of stable products of NO monoxide degradation in blood plasma is determined in the manner of Griss. Conversion of nitrates in nitritis is performed by mean of zinc power treated by ammoniac complex of copper sulphate which is added to tube with plasma. The number of endotheliocytes and their carcasses circulating in blood has been determined in the manner of Hladovic et al.

The concentration  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  in blood plasma of donors is  $23,2 \pm 1,2 \text{mkM/l}$  ( $n=41$ ), and the number of CEC  $-67,2 \pm 2,8 \text{kl/100ml}$

2. As a results of study the local concentration  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  , the of CEC and activation products of lipid peroxidation may be considered as the additional criteria of the severity degree of venous failure and it reflexes firstly the degree of inflammatory activity and injured lay of venous wall .

3. The concentration of NO degradation products in blood and urine plasma in women with acute and chronic salpingo – oophoritis has been studied. It is established that (1) in the acute stage of disease NO-producing function of endothelium is increasing in the processes of diseases and has tendency to the normalization on the final stage of recovery; (2) in patients with chronic course NO concentration in uterine and blood plasma stays reduced in comparison with analogous values in normal women and in patients with acute salpingo – oophoritis depended on the prolongation of course of disease. This is created the conditions for vascular tone increasing.

4. Within the first three days of disease the changes of hemodynamics has occurred in the development of which NO hyperproduction plays the important role . This is confirmed by the increasing level of degradation products of mentioned substance. The hemodynamics changes in patients with shigellosis are depended pathogenetically on the other mechanism action because the increasing of concentration has not marked in blood plasma in comparison with  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  concentration in blood of donors. The processes of free radicals acidifying in patients with severe gastrointestinal form of salmonellosis have

been activated on the third day of disease and in the severe colitis form of shigellosis have some slight changes from those in control group.

5. In stroke and in other critical conditions the increasing of NO synthesis is caused by the products of leukocyte activation : cytokines, free oxygen radicals, proteases, etc. and by stimulation of alpha- adrenenergetic receptors of endothelium. So, the changes of concentration of NO degradation products, reflexing its synthesis in the human endothelium of vascular tone may be useful for analysis of clinical course of stroke.

6. The determination of CEC and NO monoxide degradation products in pregnant women with non-complicated and complicated by gestosis has been conducted. In patients with gestosis the reduction of concentration of NO degradation products and CEC number increasing have been occurred. This reduction is depends on the degree of gestosis severity.

NO-producing function of endothelium and other cells have the marked dynamic changes and may be used as a marker, characterizing the expression of inflammatory let to prognose the hemodynamic changes and optimize the treatment tactic of pelvic inflammatory diseases, in acute and chronic forms, septic shock, chronic venous failure, acute changes of cerebral circulation and in gestosis.

Эндотелиальные клетки сосудов регулируют местные процессы гемостаза, пролиферации, миграции клеток крови в сосудистую стенку, пассажа растворов и макромолекул в ткани и, наконец, сосудистый тонус.

В развитии наиболее часто встречающихся сердечно-сосудистых заболеваний, таких как атеросклероз, артериальная гипертония, ключевое значение принадлежит изменениям, происходящим в сосудистой стенке. Среди новых направлений функциональной диагностики, которые начинают использоваться для оценки состояния сердечно-сосудистой системы, следует назвать и методы оценки состояния регуляции сосудистого тонуса, которые тесно связаны с оценкой функциональных свойств эндотелия, и в частности, с системой синтеза монооксида азота. Под дисфункцией эндотелия понимают дисбаланс между факторами, обеспечивающими все эти процессы.

Оксид азота (NO) первоначально был известен, как сильный вазодилататор и нейромедиатор. Однако в последнее время стало понятным, что биологические свойства NO и его роль в физиологии и патологии являются более широкими, чем эта представлялось ранее. В физиологических условиях концентрация NO в клетках постоянно колеблется, но находится на очень низком уровне. Базальный уровень NO определяется главным образом активностью эндотелиальной и

нейрональной NO-синтазами (eNOS; nNOS), и в меньшей – индуцируемой NO-синтазой (iNOS), которая в нормальных условиях, обнаруживается в лейкоцитах.

*Методы исследования эндотелиальной регуляции сосудистого тонуса*

В настоящее время предложены простые методы определения сосудо двигательной функции эндотелия, к которым относится проба с доплерографическим измерением реакции плечевой артерии на увеличение кровотока. Проба проста в выполнении, требует наличия лишь стандартного оборудования, может проводиться, в том числе и амбулаторно и столько раз, сколько это необходимо.

В определении функционального состояния эндотелия вполне информативными являются и методы определения концентрации продуктов деградации монооксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) в сыворотке крови и количества циркулирующих эндотелиальных клеток (ЦЭК) в крови.

В период с 1999 по 2003 г в ЦНИЛ ВГМУ были проведены исследования по определению концентрации стабильных продуктов деградации монооксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ) и ЦЭК при различных патологических процессах, а также их взаимосвязь с активностью перекисного окисления липидов.

**Во-первых**, был модифицирован метод определения нитратов нитритов в биологических жидкостях. Концентрацию стабильных продуктов деградации монооксида азота в плазме крови определяли по методу Грисса. Конверсию нитратов в нитриты осуществляли цинковой пылью, обработанной аммиачным комплексом сульфата меди, которую добавляли в пробирку с исследуемой плазмой [1;2]. Количество циркулирующих в крови десквамированных эндотелиоцитов и их каркасов определяли по методу Hladovic et al [7].

Концентрация  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  в плазме крови доноров оказалась равной  $23,2 \pm 1,2$  мкМ/л ( $n=41$ ), а количество ЦЭК составляло в среднем  $67,2 \pm 2,8$  кл/100мкл.

**Во-вторых**, было проведено сравнение содержания начальных и конечных продуктов перекисного окисления липидов плазмы крови, продуктов деградации NO и количества ЦЭК в крови, взятой из бедренной и локтевой вен больных хронической венозной недостаточностью нижних конечностей с уровнем этих показателей у контрольных субъектов. В результате проведенных исследований было установлено, что локальная концентрация  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ , число ЦЭК и содержание продуктов активации перекисного окисления липидов может рассматриваться в качестве дополнительных диагностических критериев степени тяжести венозной недостаточности и, в первую очередь, может отражать степень активности воспаления, а также степень повреждения эндотелиального слоя венозной стенки [4].

**В-третьих,** при воспалении уровень в крови NO увеличивается. Это увеличение связано с появлением iNOS в различных клетках. В этом случае NO приобретает роль обоюдоострого оружия. С одной стороны, с ним связаны такие положительные эффекты, как антибактериальный, антипаразитарный, противовирусный, а также противоопухолевый. С другой стороны, высокий уровень NO, если его не контролировать становится опасным. Это связано с тем, что в высоких концентрациях NO может реагировать с постоянно образующимся супероксид-анионом. При этом образуются высокотоксичные соединения, такие как пероксинитрит, который быстро превращается в нитрат-ион и гидроксильный радикал. Экспрессия iNOS очень четко контролируется. К веществам, которые индуцируют образование iNOS относятся бактериальные липополисахариды, цитокины, гамма-интерферон, фактор некроза опухоли, интерлейкин-1бета. Дексаметазон, кортикостероиды, эстрогены, трансформирующий фактор роста бета, интерлейкин 4, 8 и 10 подавляют образование iNOS. Благодаря гармоничному действию этих веществ при воспалении наблюдается некий оптимальный уровень экспрессии i-NOS при котором к минимуму сводится его противовоспалительное и повреждающее действие. В связи с этим исследовали концентрацию продуктов деградации NO в плазме крови и в моче женщин с острым и хроническим сальпингоофоритом. Было установлено, что (1) в острой стадии заболевания, NO-продуцирующая функция эндотелия возрастает в процессе развития заболевания и имеет тенденцию к нормализации на стадии клинического выздоровления; (2) у больных с хроническим течением процесса содержание NO в плазме и моче больных остается постоянно сниженным по сравнению с аналогичным показателям у здоровых женщин и у больных острым сальпингоофоритом, независимо от продолжительности течения заболевания. Это может создавать условия для увеличения сосудистого тонуса, в том числе и в органах малого таза [3].

**В-четвертых,** ключевая роль в механизмах гемодинамических расстройств при септическом шоке принадлежит липополисахариду грамотрицательных бактерий. Одним из важнейших эффектов липополисахарида является образование во многих типах клеток индуцированной изоформы NO-синтазы. Чрезмерно выраженное образование NO при септическом шоке может приводить к стойкой и выраженной артериальной гипотензии и к снижению сократительной функции миокарда. Учитывая тот факт, что динамическая оценка содержания  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ -ионов, малонового диальдегида (МДА) и диеновых конъюгатов (ДК) в плазме крови может рассматриваться в качестве одного из важнейших критериев, позволяющих прогнозировать выраженность нарушения гемодинамики при септическом шоке, было проведено исследование динамики изменения концентрации продуктов деградации

оксида азота ( $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ ), диеновых конъюгатов и малонового диальдегида в плазме крови больных тяжелыми формами сальмонеллеза и шигеллеза. У пациентов с тяжелой гастроинтестинальной формой сальмонеллеза и тяжелой колитической формой шигеллеза в первые три дня заболевания имеется существенное нарушение гемодинамики, в развитии которого может играть роль гиперпродукция NO, что подтверждается повышением уровня продуктов деградации указанного вещества. Однако при шигеллезе нарушения гемодинамики патогенетически, вероятно, зависят от действия других механизмов, поскольку в плазме крови таких больных не отмечалось возрастания концентрации нитратов/нитритов по сравнению с концентрацией  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  в крови у доноров. Процессы свободнорадикального окисления у больных тяжелой гастроинтестинальной формой сальмонеллеза активированы на третий день заболевания, а при тяжелой колитической форме шигеллеза имеют незначительные отклонения от таковых в контрольной группе. Определение показателей, отражающих интенсивность процессов свободнорадикального окисления показало, что развитие этого процесса при тяжелом сальмонеллезе и по времени, и по интенсивности отстает от процесса образования  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$ . Таким образом, у больных с тяжелыми формами сальмонеллеза развивается как «окислительный», так и «нитрозирующий» стресс, при этом степень выраженности «нитрозирующего» стресса у таких больных выше по сравнению с «окислительного» [6].

**В-пятых,** было проведено исследование динамики концентрации продуктов деградации  $\text{NO}_2/\text{NO}_3$  плазмы крови в остром периоде нарушений мозгового кровообращения разной степени тяжести и сопоставлено содержание продуктов деградации NO с интенсивностью перекисного окисления липидов и клиническими проявлениями. В результате выполненных исследований было показано, что изменение содержания продуктов деградации NO в крови, по-видимому, отражает общую реакцию организма на ишемию головного мозга. При инсульте, а возможно и при других критических состояниях, повышение синтеза NO обусловлено продуктами активации лейкоцитов: цитокинами, свободными радикалами кислорода, протеазами и т.д., а также стимуляцией альфа-адренэргических рецепторов эндотелия. Таким образом, изменение содержания продуктов деградации NO, отражающее его синтез в эндотелии кровеносных сосудов человека может быть полезным для оценки клинического течения мозгового инсульта. [5].

**В-шестых,** было проведено определение ЦЭК и продуктов деградации монооксида азота у беременных женщин с неосложненным и осложненным гестозом течением беременности. У пациенток с гестозом происходило снижение концентрации продуктов деградации NO и

увеличение количества ЦЭК. Причем их снижение зависело от степени тяжести гестоза.

Таким образом, во время воспалительных заболеваний придатков матки в острой и хронической форме, септическом шоке, хронической венозной недостаточности, острых нарушениях мозгового кровообращения и при гестозе NO-продуцирующая функция эндотелия и других клеток претерпевает выраженные динамические изменения, и может быть использована как маркер, характеризующий выраженность воспаления, позволяющий прогнозировать гемодинамические расстройства и оптимизировать тактику лечения названных форм патологии.

### *Литература*

1. Веремей И.С., Солодков А.П., Осочук С.С., Деюн Г.В., Дубровская А.В. Модифицированный метод определения  $\text{NO}_3^-$  и  $\text{NO}_2^-$  с помощью цинковой пыли в присутствии аммиачного комплекса сульфата меди // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования./ Труды респ.научно-практ. конференции. – Витебск, 2000. – С.112-115
2. Дорошенко А.С., Солодкова И.В., Солодков А.П., Шебеко В.И., Телепнева Т.В. Оценка стимулированной продукции NO в эндотелиоцитах кровеносных сосудов в ответ на усиление действия напряжения сдвига с использованием метода велоэргометрии // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования./ Труды респ. научно-практ. конференции. – Витебск, 2000. – С.125-129
3. Занько С.Н., Никитина Е.В., Солодков А.П., Шебеко В.И. Содержание продуктов деградации оксида азота (нитратов/нитритов) в крови у больных сальпингоофоритами // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования./ Труды II международной научно-практ. конференции. – Витебск, 2002. – С.165-168
4. Косинец А.Н., Сушков С.А., Солодков А.П., Хотетовская Ж.В., Таллер В.А., Небылицин Ю.С. Базальный уровень NO и количество ЦЭК кровеносных сосудов у пациентов с хронической венозной недостаточностью // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования./ Труды II международной научно-практ. конференции. – Витебск, 2002. – С.175-180
5. Метлова Г.Г., Пашков А.А., Солодков А.П., Веремей И.С. Содержание продуктов деградации монооксида азота у больных в остром периоде ишемического и геморрагического инсультов // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования./ Труды респ.научно-практ. конференции. – Витебск, 2000. – С.141-145

6. Троцкий С.В., Солодков А.П., Семенов В.М., Шебеко В.И. Значение продуктов деградации оксида азота (NO) в патогенезе бактериальных кишечных инфекций // Дисфункция эндотелия: экспериментальные и клинические исследования./ Труды II международной научно-практ. конференции. – Витебск, 2002. – С.216-221

### **КОНЦЕНТРАЦИЯ СТАБИЛЬНЫХ ПРОДУКТОВ ДЕГРАДАЦИИ NO И ЧИСЛО ЦИРКУЛИРУЮЩИХ ЭНДОТЕЛИОЦИТОВ КАК ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЙ ДИАГНОСТИЧЕСКИЙ КРИТЕРИЙ ДЛЯ ОЦЕНКИ СТЕПЕНИ ТЯЖЕСТИ ВЕНОЗНОЙ ПАТОЛОГИИ**

**Сушков С.А., Солодков А.П., Небылицин Ю.С., Хотетовская Ж.В.**

*Государственный медицинский университет, г. Витебск*

The concentration of nitric monoxide degradation products and circulating endotheliocytes were studied in venous blood of 79 patients with chronic venous failure and of 16 patients with deep venous thrombosis. It was stated that in patients with chronic venous failure of lower extremities the activation of NO-synthase system and increased level of stable products of NO degradation, especially in peripheral blood, are observed. In patients with acute and chronic failure of venous outflow the circulating endotheliocyte count is increased, and number of viable cells in blood taken from v. cubitalis is decreased. These indexes are increased in regional blood of patient with chronic venous failure. The increasing is higher if disturbance of regional hemodynamic is severer. The observed changes give us possibility to suggest that damage of venous vessels intima results in endothelium dysfunction, which can play significant role in pathogenesis of venous failure. The determination of stable products of NO degradation and circulating endotheliocytes may serve as additional criteria for evaluation of degree of venous pathology.

Длительное время считалось, что основная роль сосудистого эндотелия служить барьером для диффузии макромолекул из сосуда в интерстициальное пространство. Исследования, проведенные в последнее десятилетие, позволили выявить его другие функции - участие в регуляции тонуса сосудов, в усилении и ингибировании их роста, в процессе воспаления и свертывания крови и.т.д. Открытие роли эндотелиальных клеток в регуляции сосудистого тонуса позволило вскрыть патогенетические механизмы ряда заболеваний сердечно-сосудистой системы. К сожалению, большинство исследований посвящено патологии